

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年6月26日 (26.06.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/052097 A1(51) 国際特許分類: C12N 15/09, C12Q
1/68, C12M 1/00, H01L 29/06, 29/66

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/11150

(22) 国際出願日: 2001年12月19日 (19.12.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社日立ハイテクノロジーズ (HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORPORATION) [JP/JP]; 〒105-8717 東京都港区西新橋一丁目24番14号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 宮原 裕二 (MIYAHARA, Yuji) [JP/JP]; 〒312-8504 茨城県ひたちなか市市毛882番地 株式会社日立ハイテクノロジーズ設計・製造統括本部 那珂事業所内 Ibaraki (JP). 保田健二 (YASUDA, Kenji) [JP/JP]; 〒312-8504 茨城県ひたち

なか市市毛882番地 株式会社日立ハイテクノロジーズ 設計・製造統括本部 那珂事業所内 Ibaraki (JP). 服部 久美子 (HATTORI, Kumiko) [JP/JP]; 〒312-8504 茨城県ひたちなか市市毛882番地 株式会社日立ハイテクノロジーズ 設計・製造統括本部 那珂事業所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔 (HIRAKI, Yusuke); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル 3F Tokyo (JP).

(81) 指定国(国内): CN, JP, KR, US.

(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

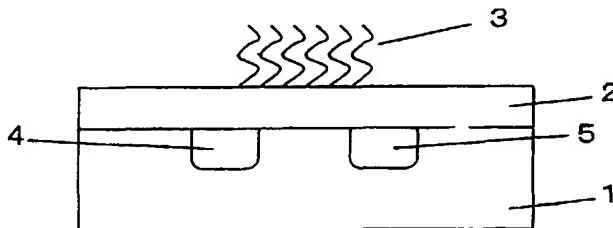
添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドブック」を参照。

(54) Title: POTENTIOMETRIC DNA MICROARRAY, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND METHOD OF ANALYZING NUCLEIC ACID

(54) 発明の名称: ポテンシオメトリックDNAマイクロアレイ、その製造方法、及び核酸解析方法



(57) Abstract: A DNA microarray system whereby measurement can be performed at a low running cost, a low price and yet a high accuracy. A nucleic acid probe (3) is immobilized on the surface of a gate insulator of an electric field effect transistor and then hybridized with a target gene on the surface of the insulator. A change in the surface electric charge density thus arising is detected by using the electric effect.

(57) 要約:

低ランニングコスト、低価格でかつ高精度の測定が可能なDNAマイクロアレイシステムである。電界効果トランジスタのゲート絶縁物表面に核酸プローブ(3)を固定化し、ターゲット遺伝子とゲート絶縁物表面でハイブリダイゼーションを行わせ、その際に生ずる表面電荷密度の変化を電界効果を利用して検出する。

WO 03/052097 A1

明 細 書

ポテンシオメトリックDNAマイクロアレイ、その製造方法、及び核酸解析方法

技術分野

本発明は、遺伝子診断、DNA配列解析、あるいは遺伝子多型解析など、バイオテクノロジーの分野、特に遺伝子検査分野の技術に関し、より詳細には、複数の異なる核酸を高精度に並列的に解析することができるポテンシオメトリックDNAマイクロアレイ、その作成方法、及び核酸解析方法に関する。

背景技術

ヒトゲノムプロジェクトをはじめ各種生物のゲノム塩基配列解析プロジェクトが急速に進展し、膨大な塩基配列情報が蓄積されつつある。既にヒトゲノムの全塩基配列が決定されつつある。今後は生体中における遺伝子の機能を明らかにすることにより、各種疾病の診断、医薬品の開発、農作物の品種改良など広範囲な分野で遺伝子関連技術の開発が飛躍的に進むものと思われる。これらの新規分野発展の基礎となるのが、塩基配列情報に加えて遺伝子の発現及び機能情報である。遺伝子の機能及び発現解析を大規模に行い、遺伝子検査へ発展させる技術として、DNAチップあるいはDNAマイクロアレイ（以下、両者を総称してDNAマイクロアレイという）がAffymetrix社、Nanogen社などで開発されている。しかし、現状のDNAマイクロアレイの多くは蛍光検出を基本原理としているので、レーザや複雑な光学系が必要となり、システムが大型化し高価である。

また、現在開発されている全てのDNAマイクロアレイは、原則として1回のみの使用で廃棄される。洗浄して繰り返し使用できたとしてもせいぜい2回から3回の使用が限度である。このため多くの試料を用いた解析や、検体の数が多い遺伝子診断などの分野ではランニングコストが大きな問題となる。特に医療の分野では医療費抑制の観点からも、高額な検査が広く普及することは困

難である。一方では、医療の分野、すなわち遺伝子診断の分野では高い精度、定量性が求められる。したがってコスト低減と高精度化の両方を満足させる技術が求められる。

これらの問題を解決する方法として、酸化・還元標識と組み合わせた電流検出方式のDNAマイクロアレイがいくつが報告されている。Clinical Micro Sensors社では分子ワイヤーと称する分子の一端を金属電極上に固定化し、他端に核酸プローブを結合させ、ターゲット遺伝子とのハイブリダイゼーションに基づく酸化・還元標識と金属電極の電子の授受を電流変化として検出し、ターゲット遺伝子を検出する方式を開発している (Nature Biotechnology, vol. 16, (1998) p27, p. 40)。この方式では高価なレーザや複雑な光学系を必要としないため、簡単で小型のシステムを構築することができる。しかしながら、金属電極上での酸化・還元反応を検出の基本原理としているため、試料中に酸化物質あるいは還元物質（例えばアスコルビン酸）が存在すると、酸化又は還元に基づく電流が流れ、遺伝子検出の妨害となり検出精度が劣化する。また、電流計測に伴い、金属電極上で電極反応が進行する。電極反応は不可逆で非平衡反応であるため電極の腐食、ガスの生成などが生じ、電流測定の安定性が損なわれ、特に繰返し測定する場合に検出精度が劣化する。

そこで本発明は低ランニングコスト、低価格システムでかつ高精度の測定が可能なDNAマイクロアレイとその製造方法、及びそのDNAマイクロアレイを用いた核酸解析方法を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明は、絶縁物表面に核酸プローブを固定化し、ターゲット遺伝子と絶縁物表面でハイブリダイゼーションを行い、その際に生じる電荷密度の変化を検出するDNAマイクロアレイである。好ましくは、電界効果トランジスタのゲート絶縁物表面に核酸プローブを固定化し、ターゲット遺伝子とゲート絶縁物表面でハイブリダイゼーションを行わせ、その際に生ずる表面電荷密度の変化を電界効果を利用して検出する方式のDNAマイクロアレイである。表面電荷密度の変化を大きくするために、核酸自身が持っている電荷に加えて、インタ

一カレータの導入やイオンなどの荷電粒子と複合体を形成する分子を核酸に標識するなどして、大きな信号／雑音比で表面電位変化のポテンシオメトリック検出が可能なDNAマイクロアレイを実現した。本発明のDNAマイクロアレイを用いた遺伝子解析法は、高価なレーザや複雑な光学検出系を必要とせず、また電流検出（アンペロメトリック）方式と異なり、絶縁物基板に核酸プローブを固定化して平衡状態での表面電位を検出するので、基板の腐食やガスの発生、酸化／還元物質の妨害などによる信号値の不安定性は問題とならず、安定性に優れた高精度の遺伝子検出が可能となる。

すなわち、本発明によるポテンシオメトリックDNAマイクロアレイは、ゲート絶縁物表面に直接又は担体を介して一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブを固定化した複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタと、参照電極とを備えることを特徴とする。

本発明によるポテンシオメトリックDNAマイクロアレイは、また、複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタが形成された基板を備え、基板の表面において、各絶縁ゲート電界効果トランジスタのチャネル部のゲート絶縁物上に直接又は担体を介してそれぞれ異なる種類の一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブを固定化したことを特徴とする。

本発明によるポテンシオメトリックDNAマイクロアレイは、また、検出すべき核酸の一部と相補的な塩基配列を有する核酸プローブを直接又は担体を介してゲート絶縁物表面に固定化した第1の絶縁ゲート電界効果トランジスタと、検出すべき核酸のどの部分とも相補的ではない塩基配列を有する核酸プローブを直接又は担体を介してゲート絶縁物表面に固定化した第2の絶縁ゲート電界効果トランジスタと、第1の絶縁ゲート電界効果トランジスタと第2の絶縁ゲート電界効果トランジスタの出力を比較検出する回路とを備えることを特徴とする。

本発明による核酸解析方法は、(a) それぞれ異なる種類の一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブがゲート絶縁物表面に直接又は担体を介して固定化された複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタを有する基板上に、少なくとも1種類の核酸を含む試料溶液を導入して、一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブ

ロープとハイブリダイゼーションを行わせるステップと、(b) 洗浄液を基板上に導入して、未反応の核酸を前記基板上から除去するステップと、(c) インターカレータ溶液を基板上に導入して、二本鎖となった核酸と反応させるステップと、(d) 洗浄液を基板上に導入して、未反応のインターハレータを基板上から除去するステップと、(e) 緩衝液を基板上に導入して、絶縁ゲート電界効果トランジスタの出力値を測定するステップとを有することを特徴とする。

上記ステップ(a)からステップ(e)に加えて、(f) 基板を加熱して一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブとハイブリダイズした核酸を解離させるステップと、(g) 洗浄液を基板上に導入して、一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブから解離した核酸及びインターハレータを除去するステップとを更に有し、その後、前記ステップ(a)からステップ(e)を反復するようになると、複数の測定を連続して行うことができる。

本発明による核酸解析方法は、また、(a) それぞれ異なる種類の一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブがゲート絶縁物表面に直接又は担体を介して固定化された複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタを有する基板上に、荷電粒子を取り込みうる分子で標識された核酸断片を含む試料溶液を導入して、一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブとハイブリダイゼーションを行わせるステップと、(b) 洗浄液を基板上に導入して、未反応の核酸断片を基板上から除去するステップと、(c) 標識分子と複合体を形成するイオンを含む溶液を基板上に導入して、二本鎖となった核酸に標識されている分子と反応させ、イオンと標識分子との複合体を形成させるステップと、(d) 絶縁ゲート電界効果トランジスタの出力値を測定するステップとを備えることを特徴とする。

荷電粒子を取り込みうる分子は、1価又は2価の陽イオン又は陰イオンと選択的に複合体を形成する分子、例えば、バリノマイシン、ノナクチン／モナクチン、ビスクラウンエーテル、カリックスアレン誘導体、非環状ポリエーテル誘導体、第4級アンモニウム塩、ポルフィリン、又はこれらの分子の誘導体とすることができます。

このとき、荷電粒子を取り込みうる複数種類の分子をそれぞれ異なる核酸断

片に標識し、各分子に対応した荷電粒子（イオン）を基板上に導入することにより複数種類の遺伝子又は遺伝子多型を同時又は順次に測定することができる。

前記ステップ（a）からステップ（d）に加えて、（e）基板を加熱して一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブとハイブリダイズした核酸断片を解離させるステップと、（g）洗浄液を基板上に導入して、一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブから解離した核酸断片を除去するステップとを更に有し、その後、前記ステップ（a）からステップ（d）を反復するようにすると、複数の測定を連続して行うことができる。

本発明によるポテンシオメトリックDNAマイクロアレイの製作方法は、絶縁物基板の第1の表面にシリコン膜を形成するステップと、シリコン膜をパターニングして複数のシリコン膜形成領域に分離するステップと、各シリコン膜形成領域中にそれぞれ電界効果トランジスタのソース・ドレイン領域、ヒータ、温度センサとなる複数のp-n接合を形成するステップと、ソース・ドレイン領域の間をチャネルとし、ソース・ドレイン領域から信号配線を形成するステップと、絶縁物基板のシリコン膜を形成した面と反対側の第2の表面において、電界効果トランジスタのチャネルに対応する部分に核酸プローブを直接又は担体を介して固定化するステップとを有することを特徴とする。

本発明によるポテンシオメトリックDNAマイクロアレイの製作方法は、また、絶縁物基板の表面にシリコン膜を形成するステップと、シリコン膜をパターニングして複数のシリコン膜形成領域に分離するステップと、各シリコン膜形成領域中にそれぞれ電界効果トランジスタのソース・ドレイン領域、ヒータ、温度センサとなる複数のp-n接合を形成するステップと、ソース・ドレイン領域の間をチャネルとし、ソース・ドレイン領域から信号配線を形成するステップと、信号配線を形成した面の上に絶縁膜を形成するステップと、絶縁膜の表面において、電界効果トランジスタのチャネルに対応する部分に核酸プローブを直接又は担体を介して固定化するステップとを有することを特徴とする。

図面の簡単な説明

図1は、本発明による遺伝子検出用電界効果トランジスタの一例を説明する

断面模式図である。

図2は、本発明の遺伝子検出用電解効果トランジスタを用いた測定システムの構成例を示す図である。

図3は、本発明のDNAマイクロアレイとインターラーニングを組み合わせた測定システムの説明図である。

図4は、本発明のDNAマイクロアレイと標識分子を組み合わせた測定システムの説明図である。

図5は、本発明の薄膜ゲート型遺伝子検出用FETチップ(DNAマイクロアレイ)の製作工程を説明する図である。

図6は、本発明のDNAマイクロアレイの一例を示す平面図である。

図7は、FET、ヒーター、温度センサの配置例の説明図である。

図8は、本発明のDNAマイクロアレイを裏面から見た斜視図である。

図9は、本発明による放熱フィン付DNAマイクロアレイを示す平面図である。

図10は、本発明による放熱フィン付DNAマイクロアレイを裏面から見た斜視図である。

図11は、本発明による薄膜ゲート型遺伝子検出用FETチップの一例を示す断面図である。

図12は、本発明による薄膜ゲート型遺伝子検出用FETチップの他の例を示す断面図である。

図13は、本発明の薄膜ゲート型遺伝子検出用FETチップを用いた測定システムの説明図である。

図14は、本発明の遺伝子検出用FETチップを装備したフローセルの説明図である。

図15は、図14に示したフローセルの分解図である。

図16は、本発明の遺伝子検出用FETによる測定プロトコルの説明図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明をより詳細に説述するために、添付の図面に従ってこれを説明する。以下の図において、同じ機能部分には同じ符号を付けて説明する。

[実施例 1]

図 1 は、本発明による遺伝子検出用電界効果トランジスタの一例を説明する断面模式図である。

絶縁ゲート電界効果トランジスタ 1 のゲート絶縁物 2 の表面に核酸プローブ 3 を固定化した構造である。核酸プローブはオリゴヌクレオチド又は cDNA 又は途中で枝分かれしたDNAの断片を用い、通常 300 個以下の塩基から構成されており、適切な反応条件の下で測定すべきターゲット遺伝子とハイブリダイズでき、オリゴヌクレオチドの場合は 80 個以下の塩基長の核酸断片であることが望ましい。ゲート絶縁物は酸化シリコン (SiO₂)、窒化シリコン (SiN)、酸化アルミニウム (Al₂O₃)、酸化タンタル (Ta₂O₅) などの材料を単独又は組み合わせて用い、通常はトランジスタ動作を良好に保つため、酸化シリコン (SiO₂) の上に窒化シリコン (SiN)、酸化アルミニウム (Al₂O₃)、酸化タンタル (Ta₂O₅) を積層する二層構造とする。

核酸プローブを上記絶縁物表面に固定化するために、核酸プローブの一端をアミノ基 (NH₂基)、チオール基 (SH基)、ビオチンなどで化学修飾する。アミノ基で化学修飾した核酸プローブを用いる場合は、絶縁物の表面をアミノプロピルエトキシシラン、ポリリジンなどで化学修飾して絶縁膜表面にアミノ基を導入し、グルタルアルデヒドやフェニレンジイソシアネート (PDC) と反応させてアミノ基で化学修飾した核酸プローブを絶縁物表面に固定化する。チオール基で化学修飾した核酸プローブを絶縁物表面に固定化する場合は、絶縁物上に金薄膜を形成し、チオール基と金との親和性を利用して核酸プローブを固定化する。また、ビオチンで化学修飾した核酸プローブを固定化する場合には、絶縁物表面にストレプトアビシンを導入し、ビオチンとストレプトアビシンの親和性を利用して、核酸プローブをゲート絶縁物表面に固定化する。実際の固定化に際しては、核酸プローブを含む溶液を FET のチャネル上のゲート絶縁物表面にのみ滴下又はスポットし、チャネル部のゲート絶縁物上にのみ核酸プローブを固定化する。

一方、FETのゲート絶縁物表面に固定化担体を形成し、核酸プローブを該固定化担体の表面又は内部に間接的に固定化してもよい。固定化担体の材料としては、アガロース、ポリアクリルアミド、ポリヒドロキシエチルメタクリレート（pHEMA）などを用いることができ、固定化担体をアミノ基やストレプトアビシンなどで化学修飾し、上記したように、それぞれグルタルアルデヒドやPDC、又はアビシンとの親和性を利用して核酸プローブを固定化担体に固定化することができる。このように固定化担体を介して間接的にFETのゲート絶縁物上に核酸プローブを形成することもできる。

試料中に測定すべきターゲット遺伝子を含む多数の遺伝子が存在し、上記遺伝子検出用FETのゲート絶縁物上にターゲット遺伝子と相補的塩基配列を有する核酸プローブが固定化されていると、適切な反応条件のもとでターゲット遺伝子と核酸プローブがハイブリダイズして、ターゲット遺伝子と核酸プローブが複合体を形成する。反応に用いるバッファ溶液のpHの適切な条件下では、核酸は負に帯電している。したがって、ハイブリダイズによる複合体形成によりFETのゲート絶縁物近傍で電荷密度が変化し、ゲート絶縁物の表面電位が変化する。この変化がFETのゲート電圧変化と同等の作用となり、チャネルの導電率を変化させる。したがって、ソース4及びドレイン5の間を流れるドレイン電流変化として複合体の形成、すなわちターゲット遺伝子の存在を検出することができる。

〔実施例2〕

図2は、図1に示した遺伝子検出用電解効果トランジスタ（Genetic FET）を用いた遺伝子検査システムの構成例を示す図である。

この遺伝子検査システムは、図1に示した遺伝子検出用FET1の他に参照FET6を用い、遺伝子検出用FETと参照FETの差動測定を行う。遺伝子検出用FET1のゲート絶縁物表面には試料中のターゲット遺伝子と相補的な塩基配列を有する核酸プローブ3が固定化されている。一方、参照FET6のゲート絶縁物表面にはターゲット遺伝子と相補的な塩基配列とは異なる塩基配列を有する核酸プローブ7が固定化されている。

このような差動測定を行うことにより、FETの電気的特性の違いによる周

周の温度や光の変化による出力値の変化を補償したり、あるいは試料中の荷電粒子がゲート絶縁物上に非特異的に吸着することによる出力値の変化を相殺して、ターゲット遺伝子と核酸プローブのハイブリダイゼーションによる出力変化のみを精度良く検出することができる。遺伝子検出用 FET と参照 FET は電気的特性がそろっているのが望ましいので、同じ基板に集積化された一対の FET を用いることが望ましい。

遺伝子検出用 FET と参照 FET の表面電位を安定に測定するために、電位測定の基準となる参照電極 8 を設置する。参照電極は通常、所定組成・濃度の内部溶液に銀／塩化銀電極又はかんこう電極を浸漬した電極が用いられ、塩橋又は多孔性材料による液絡部で内部溶液と試料溶液が接触する構成のものを用いる。遺伝子検出用 FET 1 と参照 FET 6 は駆動回路 9 によりそれぞれの表面電位を計測し、2つの出力は差動測定回路 10 を介して信号処理回路 11 に入力される。複数の遺伝子検出用 FET を集積化して複数遺伝子を同時計測する場合、参照 FET を共通に使用することができ、異なる遺伝子検出用 FET と共通の参照 FET との差動測定を行う。

〔実施例 3〕

図 3 は、本発明のDNAマイクロアレイとインターラーティングを組み合わせた測定システムの説明図である。図示した例のDNAマイクロアレイの場合、3個の Genetic FET 12～14 が集積化されており、第 1 の FET 12 は第 1 のターゲット遺伝子を検出する遺伝子検出用 FET、第 2 の FET 13 は第 2 の遺伝子を検出する遺伝子検出用 FET、第 3 の FET 14 は参照 FET として用いられる。第 1、第 2 の FET のゲート絶縁物上にはそれぞれ第 1、第 2 の遺伝子と相補的な塩基配列を有する核酸プローブが固定化されている。参照 FET のゲート絶縁物表面には第 1 及び第 2 の遺伝子の相補的塩基配列とは異なる塩基配列を有する核酸プローブが固定化されている。

図 3 は、第 1 の遺伝子のみを含有する試料溶液を上記集積化 DNA マイクロアレイに導入し、ターゲット遺伝子とハイブリダイゼーションを行わせた後、インターラーティングを作用させたときの状態を示している。第 1 の遺伝子は第 1 の FET 13 の核酸プローブとのみハイブリダイズして二本鎖を形成する。イ

ンターカレータ 15 は二本鎖の核酸とのみ反応して結合し、一本鎖の核酸には結合しない。インターフェーチャー 15 は電荷を有しているので、第 1 の遺伝子検出用 FET 12 の表面電荷密度のみが変化して FET の出力信号が変化し、第 2 の遺伝子検出用 FET 13 及び参照 FET 14 の表面電荷密度は変化しないので出力信号が変化しない。したがって、第 1 の遺伝子検出用 FET 12 と参照 FET 14 の差動測定、及び第 2 の遺伝子検出用 FET 13 と参照 FET 14 の差動測定を行うことにより、前者の出力信号のみが変化して第 1 のターゲット遺伝子が検出される。または、第 1 の遺伝子検出用 FET 12 と参照 FET 14 の出力比の測定、及び第 2 の遺伝子検出用 FET 13 と参照 FET 14 の出力比の測定を行うことにより、前者の出力比が変化して第 1 のターゲット遺伝子が検出される。このように複数の FET の出力を比較することでターゲット遺伝子が検出できる。インターフェーチャーとしてはエチジウムプロマイド、ヘキスト 33258 (Hoechst 33258) などを用いることができる。

具体例について以下に説明する。アルコールデヒドロギナーゼ関連遺伝子には一塩基多型 (SNPs) が存在することが知られており、その一塩基多型部位をはさんで前後 8 塩基を有する 17 塩基長の第 1 及び第 2 の核酸プローブを合成した。その塩基配列を下に示す。

第 1 核酸プローブ : 5' - C A T A C A C T A A A G T G A A A - 3'

第 2 核酸プローブ : 5' - C A T A C A C T G A A G T G A A A - 3'

5' 末端から 9 番目の部位が SNP 部位であり、第 1 核酸プローブではその部位の塩基が A、第 2 プローブでは G となっている。この第 1 及び第 2 の核酸プローブをそれぞれ第 1 及び第 2 の FET のゲート上に固定化する。参照用 FET のゲートには第 1 、第 2 の核酸プローブと異なる配列を有する核酸プローブ、例えばすべて A から構成される 17 塩基長の核酸プローブを固定化する。参照用 FET のゲート上には核酸プローブを固定化しなくてもよい。上記核酸プローブの 5' 末端をアミノ基で修飾する。一方、本実施例の FET のゲート絶縁膜には塗化シリコンが用いられており、その表面を γ -アミノプロピルトリエトキシシランで化学修飾して塗化シリコン表面にアミノ基を導入する。核酸プローブのアミノ基と塗化シリコンのアミノ基を例えばグルタルアルデヒド

のような2官能性試薬と反応させ、シップ塩基による結合を形成することにより、核酸プローブを塗化シリコン表面に固定化する。

試料は、血液中の白血球からヒトゲノムを抽出し、上記S N P部位を含む100塩基長の領域を増幅した後、第1、第2の遺伝子検出用F E T、及び参照F E Tに導入して、45℃で8時間、ハイブリダイゼーションを行わせた。ハイブリダイゼーション後、緩衝液により洗浄して未反応の試料を除去し、インターラーカタとしてエチジウムプロマイドを導入した。測定はまず第1、第2の遺伝子検出用F E T、及び参照F E Tに緩衝液を導入して、それぞれのF E Tの出力電圧、第1の遺伝子検出用F E Tと参照用F E Tの差動出力、及び第2の遺伝子検出用F E Tと参照用F E Tの差動出力を測定し、その後、試料を導入、ハイブリダイゼーション、洗浄後、インターラーカタを導入し、それぞれのF E Tの出力電圧、第1の遺伝子検出用F E Tと参照用F E Tの差動出力、及び第2の遺伝子検出用F E Tと参照用F E Tの差動出力を測定した。試料及びインターラーカタ導入前後の出力電圧の変化を測定した。

第1の核酸プローブに対応する塩基配列を有する試料(Normal)では、第1の遺伝子検出用F E Tと参照用F E Tの差動出力は5.0mVであった。一方、第2の遺伝子検出用F E Tと参照用F E Tの差動出力は0.5mVであり、有意な差が得られた。これら一連の差動出力測定は同時に行われることが望ましいが、同一検査時間内であれば順次行うこともできる。第2の核酸プローブに対応する塩基配列を有する試料(Mutant)では第1の遺伝子検出用F E Tと参照用F E Tの差動出力は0.3mVであった。一方、第2の遺伝子検出用F E Tと参照用F E Tの差動出力は4.0mVでありやはり有意な差が得られた。第1と第2の核酸プローブに対応する塩基配列を半分ずつ有する試料(ヘテロ)では第1の遺伝子検出用F E Tと参照用F E Tの差動出力は2.3mV、第2の遺伝子検出用F E Tと参照用F E Tの差動出力は2.0mVであり、ほぼ1対1の比が得られた。以上より、本発明によるS N P解析により、Normal/Normalのホモ、Mutant/Mutantのホモ、Normal/Mutantのヘテロの3種類の試料を識別することができた。インターラーカタ使用の場合は、試料D N Aに標識化合物を化学結合して標識する必要が無い。

図2に示したように、インターラーティングを使用せず、ターゲットDNAが本来有している電荷だけで検出する場合には、Normal/NormalあるいはMutant/Mutantのホモの試料の測定において、遺伝子検出用FETと参照用FETの差動出力は2.2mVの大きさであった。したがって、インターラーティングの使用により、約2倍の高感度化を図ることができた。

[実施例4]

図4は、本発明のDNAマイクロアレイと標識分子を組み合わせた測定システムの説明図である。図示した例のDNAマイクロアレイの場合、3個のGenetic FET 12～14が集積化されており、第1のFET 12は第1のターゲット遺伝子を検出する遺伝子検出用FET、第2のFET 13は第2の遺伝子を検出する遺伝子検出用FET、第3のFET 14は参照FETとして用いられる。第1、第2のFETのゲート絶縁物上にはそれぞれ第1、第2の遺伝子と相補的な塩基配列を有する核酸プローブが固定化されている。参照FETのゲート絶縁物表面には第1及び第2の遺伝子の相補的塩基配列とは異なる塩基配列を有する核酸プローブが固定化されている。

図4は、第1の遺伝子のみを含有する試料溶液を上記集積化DNAマイクロアレイに導入し、ターゲット遺伝子とハイブリダイゼーションを行わせたときの状態を示している。第1の遺伝子は第1のFETの核酸プローブとのみハイブリダイズして二本鎖を形成する。第1の遺伝子には帯電した分子又はイオンと複合体を形成する分子16が標識されており、上記の特異的なハイブリダイゼーションによりゲート絶縁物表面の電荷密度が変化する。第2の遺伝子検出用FET及び参照FETの表面電荷密度は変化しないので出力信号が変化しない。したがって、第1の遺伝子検出用FETと参照FETの差動測定、及び第2の遺伝子検出用FETと参照FETの差動測定を行うことにより、前者の出力信号のみが変化して第1のターゲット遺伝子が検出される。

イオンと複合体を形成する分子（リガンド）としては、バリノマイシン、ノナクチニン／モナクチニン、ビスクラウンエーテル、カリックスアレン誘導体、非環状ポリエーテル誘導体、第4級アンモニウム塩などが用いられる。例えばタ

一ゲット遺伝子をビス12クラウン4 (Bis(12-crown-4)) で標識する場合、ビス12クラウン4はナトリウムイオンと選択的に複合体を形成するので、ゲート絶縁物上の核酸プローブとハイブリダイズさせた後、ナトリウムイオンを含む緩衝液をDNAマイクロアレイ上に導入すると、ビス12クラウン4とナトリウムイオンが選択的に複合体を形成し、ゲート絶縁物表面の電荷密度が局所的に変化する。この変化をFETで検出する。

本実施例の具体的応用としてSNP解析を行った例について以下に説明する。実施例3で示したアルコールデヒドロギナーゼ関連遺伝子を用い、

第1核酸プローブ (Normal) : 5' - C A T A C A C T A A A G T G A A A -
3'

第2核酸プローブ (Mutant) : 5' - C A T A C A C T G A A G T G A A A -
3'

をそれぞれ第1及び第2の遺伝子検出用FETのゲート上に固定化する。参照用FETのゲートには第1、第2の核酸プローブと異なる配列を有する核酸プローブ、例えばすべてAから構成される17塩基長の核酸プローブを固定化する。試料DNAは血液中の白血球から抽出し、SNP部位を含む100塩基長の領域を増幅すると同時に、Normal DNAにはバリノマイシン、Mutant DNAにはビスクラウンエーテルで標識化した。

Normal DNAからなる試料を第1、第2の遺伝子検出用FET、及び参照FETに導入して、45°Cで8時間、ハイブリダイゼーションを行わせた。ハイブリダイゼーション後、緩衝液により洗浄して未反応の試料を除去し、50mMのNaCl水溶液を導入して、第1、第2の遺伝子検出用FET及び参照FETの出力電圧、第1の遺伝子検出用FETと参照用FETの差動出力、及び第2の遺伝子検出用FETと参照用FETの差動出力を測定した。第1の遺伝子検出用FETと参照用FETの差動出力は4mV、第2の遺伝子検出用FETと参照用FETの差動出力0.2mVであった。その後、50mM KCl水溶液を導入して同様に出力電圧を測定した結果、第1の遺伝子検出用FETと参照用FETの差動出力は0.1mV、第2の遺伝子検出用FETと参照用FETの差動出力0.3mVであり、試料中のNormal DNAは第1の核酸プローブ

プローブとのみハイブリダイゼーション反応し、第1の遺伝子検出用FETが選択的に応答することが確認された。

一方、Mutant DNAからなる試料を、上記と同様に測定すると、50mMのNaCl水溶液を導入したときの第1の遺伝子検出用FETと参照用FETの差動出力は0.1mV、第2の遺伝子検出用FETと参照用FETの差動出力0.2mVであった。50mM KCl水溶液導入後の第1の遺伝子検出用FETと参照用FETの差動出力は0.1mV、第2の遺伝子検出用FETと参照用FETの差動出力5.0mVであり、試料中のMutant DNAは第2の核酸プローブとのみハイブリダイゼーション反応し、第2の遺伝子検出用FETが選択的に応答することが確認された。NormalとMutantのDNAを半分ずつ有する試料（ヘテロ）では、50mMのNaCl水溶液を導入したときの第1の遺伝子検出用FETと参照用FETの差動出力は2.3mV、第2の遺伝子検出用FETと参照用FETの差動出力は0.1mVであり、50mM KCl水溶液導入後の第1の遺伝子検出用FETと参照用FETの差動出力は0.1mV、第2の遺伝子検出用FETと参照用FETの差動出力2.5mVであり、ほぼ1対1の比が得られた。

以上より、本発明によるSNP解析により、Normal/Normalのホモ、Mutant/Mutantのホモ、Normal/Mutantのヘテロの3種類の試料を識別することができた。本実施例では、SNP解析の工程に、ハイブリダイゼーションとイオン-リガンド複合体の形成の2つの選択的化学反応工程が含まれている。したがって、高精度のSNP解析を行うことができる。

SNP解析以外に、多数種類の核酸プローブをFETのゲート上に固定化し、バリノマイシンとビスクラウンエーテルをそれぞれターゲット用と参照用の試料に標識化し、発現解析を行うこともできる。

[実施例5]

図5は、本発明による薄膜ゲート型遺伝子検出電界効果トランジスタを備えるDNAマイクロアレイの製造工程例を示す図である。まず、図5(a)に示すように、ガラス基板17に低圧化学気相成長法(Low pressure chemical vapor deposition)により、p型のポリシリコン薄膜19を形成する。ポリシリコン

薄膜の厚さは10～10000nmの範囲が望ましく、本実施例では1000nmとした。次に、図5（b）に示すように、ポリシリコン膜のパターニングと酸化を行う。フォトリソグラフィプロセスにより、レジスト塗布、フォトマスクを介した光照射、レジスト現像を行い、ドライエッチングあるいはフッ酸と硝酸の混合液によるウエットエッチングにより、シリコン膜形成領域19を形成する。その後、酸素雰囲気中、900℃でシリコン膜を熱酸化し、ポリシリコン薄膜19の表面に二酸化シリコン膜44を形成する。

次に、図5（c）に示すように、酸化膜のエッチングと不純物核酸領域の形成を行う。フォトリソグラフィプロセスにより、レジスト塗布、フォトマスクを介した光照射、レジスト現像を行い、ドライエッチングあるいはフッ酸とフッ化アンモニウムの混合液によるウエットエッチングにより、不純物拡散領域の二酸化シリコン膜を除去する。As⁺又はP⁺のイオン注入によりp型のポリシリコン薄膜19の中にn型領域を形成し、pn接合20を設ける。その後、酸素雰囲気中、900℃で不純物拡散領域のシリコン膜を熱酸化し、その表面に二酸化シリコン膜44を形成する。

次に、図5（d）に示すように、金属電極配線を形成する。フォトリソグラフィプロセスにより、レジスト塗布、フォトマスクを介した光照射、レジスト現像を行い、ドライエッチングあるいはフッ酸とフッ化アンモニウムの混合液によるウエットエッチングにより、電極用コンタクト穴部の二酸化シリコン膜を除去する。アルミニウム薄膜を真空蒸着により形成し、フォトリソグラフィプロセスにより、レジスト塗布、フォトマスクを介した光照射、レジスト現像を行い、りん酸によるウエットエッチングによりアルミニウム配線25をパターン形成し、外部回路との接続を行った。水素雰囲気中でアニールし、それぞれFETのソース・ドレイン領域21、ヒーター22、温度センサ23とする。ソース、ドレイン領域の間が電界効果トランジスタのチャネル24となる。

最後に、図5（e）に示すように、DNAプローブを固定化する。ガラス基板17の第2の表面（シリコン膜を形成した面と反対の表面）26において、電界効果トランジスタのチャネルに対応する部分に核酸プローブ3を固定化し、遺伝子検出用FETとする。測定の高精度化を図るために、少なくとも遺伝子

検出用FET、参照FET、ヒーター、温度センサを同一のシリコン膜形成領域19の中に集積化することが望ましい。

絶縁物基板17の表面のうち、核酸プローブ3が形成された表面は溶液が導入されるため、配線、トランジスタなどの電子デバイスの信号線が時として溶液に接触して短絡し、動作不良を起こすことがある。本実施例では、溶液が接触する、核酸プローブ3が形成された面と反対側の面に配線25を形成し、信号線を取り出す構造としたので、溶液への接触による動作不良の問題は無くなり、信頼性の高い測定システムを提供することができる。

図6は、こうして作製されたDNAマイクロアレイの一例を示す平面図である。本例のDNAマイクロアレイは、絶縁物基板17に144個のシリコン膜形成領域19が分離形成されている。一つのシリコン膜形成領域19の大きさは500μm角である。シリコン膜形成領域19を裏面から見たときの拡大図を図7に示す。シリコン膜形成領域19の中にそれぞれ複数のpn接合20を形成した。シリコン膜がp型の場合はn型の不純物拡散領域を形成し、シリコン膜がn型の場合にはp型の不純物拡散領域を形成する。これらの不純物拡散領域を電界効果トランジスタのソース、ドレイン領域21、あるいはヒーター22、あるいは温度センサ23とした。各不純物拡散領域は電気配線25により外部の駆動回路と接続している。

図7に示すように、本実施例では1つのシリコン膜形成領域19に2個の電界効果トランジスタが形成されており、その1つを遺伝子検出用FET、他を参照FETとした。温度センサ23の出力を用いてヒーター22を制御することにより各シリコン膜形成領域19の温度を所定の値に設定することができ、解離温度 (melting temperature, Tm) のそろった核酸プローブを同一のシリコン膜形成領域19の遺伝子検出用FET上に固定化し、解離温度の異なる核酸プローブを異なるシリコン膜形成領域に固定化することにより、高精度の遺伝子検出を実現することができる。温度変化に伴いFETの特性も変化するが、遺伝子検出用FETと参照FETの差動測定を行うことにより、各FET出力の温度変化を相殺することができる。

図8に、図6に示したDNAマイクロアレイを裏面からみた斜視図を示す。

電気配線 25 は裏面に形成され、核酸プローブは反対側の面に固定化される。

[実施例 6]

図 9 及び図 10 を用いて本発明の他の実施例を説明する。図 9 は本発明による放熱フィン付 DNA マイクロアレイを示す平面図、図 10 はそれを裏面から見た斜視図である。

実施例 5 と同様に、絶縁物基板 17 の第 1 の表面 18 にシリコン膜を形成し、フォトリソグラフィとエッチングにより不要な部分のシリコン膜を除去して、複数のシリコン膜形成領域 19 に分離した。シリコン膜の厚さは 0.1 ~ 1.0 μm の範囲が好ましく、本実施例では 1 μm とした。各シリコン膜形成領域 19 には、実施例 5 と同様に、遺伝子検出用 FET、参照 FET、ヒーター及び温度センサが形成されている。

各遺伝子検出用 FET に形成する核酸プローブの解離温度に応じて、それぞれ最適な反応温度でハイブリダイゼーション・洗浄を行うため、本実施例では各シリコン膜形成領域 19 を囲うように格子状の放熱フィン 27 をシリコン膜で形成し、各シリコン膜形成領域 19 の温度制御精度を向上させた。放熱フィン 27 はシリコン膜で形成されているので熱伝導性がよく、隣接するシリコン膜形成領域で発生する熱を効率よく放熱し、隣のシリコン膜形成領域への影響を低減し、独立に各シリコン膜形成領域 19 の温度を制御することができる。本実施例では、一つのシリコン膜形成領域 19 の大きさは 1 mm 角、シリコン膜形成領域 19 と放熱フィン 27 との間隔は 0.5 mm、放熱フィン 27 の幅は 0.5 mm とし、この構造により各シリコン膜形成領域 19 の温度を室温から 95 °C まで 1 °C の精度で制御できた。

図 10 は上記チップを裏面から見た斜視図である。本実施例ではシリコン膜形成領域及び放熱フィンをウエットエッチング技術により形成したため、その断面形状は三角形及び台形になっているが、たとえば、リアクティブ・イオン・エッチング (Reactive Ion Etching) 技術を用いれば矩形状の断面形状のシリコン膜形成領域及び放熱フィンを製作することができる。

[実施例 7]

図 11 は、本発明による薄膜ゲート型遺伝子検出用 FET チップの一例を示

す断面図である。

本実施例の薄膜ゲート型遺伝子検出用FETチップは、実施例5で説明したDNAマイクロアレイにおいて、遺伝子検出用FET及び参照FETのゲート部のガラス基板を薄くした構造である。薄膜ゲート部28のガラス基板の厚さは0.01～1μmの範囲が好ましく、本実施例では0.1μmとした。本構造により、FETのトランスコンダクタンスを大きくすることができ、ゲート上で起こる電荷の変化を高感度に検出することができる。FETのゲート部のみの薄膜化だけではなく、シリコン膜形成領域のガラス基板部分全体を薄膜化することもでき、薄膜化した凹部を反応セルとして使用することができる。

[実施例8]

図12は、本発明による薄膜ゲート型遺伝子検出用FETチップの他の例を示す断面図である。

実施例5、6、7ではシリコン薄膜形成領域と反対面のガラス表面上に核酸プローブ3を形成する方式であるが、本実施例ではシリコン薄膜形成領域19上に形成した絶縁膜2であるシリコン酸化膜の上に、第2の絶縁膜29を形成し、その上に核酸プローブ3を固定化した。第2の絶縁膜29の材料としては窒化シリコン、酸化アルミニウム、酸化タンタルを用いることができる。本実施例ではFETのゲート絶縁膜の厚さを正確にコントロールすることができ、トランスコンダクタンスを大きくし、ゲート上で起こる電荷の変化を高感度に検出することができる。

[実施例9]

図13は、本発明の薄膜ゲート型遺伝子検出用FETチップを用いた測定システムの一例を説明する図である。

少なくとも遺伝子検出用FET及び参照FETを搭載したDNAマイクロアレイチップをフローセル30にマウントし、流路31に接続する。流路31にはハイブリダイゼーション液32及び洗浄液33がバルブ34を介して接続されており、ポンプ35を駆動して、ハイブリダイゼーション液及び洗浄液をフローセル30に導入することができる。また、試料及びインターラーベタは分注器36によりバルブ34中に分注し、フローセル30に導入して遺伝子検出

用 F E T 及び参照 F E T と反応させることができる。反応後、使用済みの液はポンプ 3 5 により廃液ボトル 3 7 に送られる。反応後の遺伝子検出用 F E T 及び参照 F E T の出力は信号処理回路 3 8 により処理／演算される。

図 1 4 に、フローセル 3 0 の構造を示す。フローセル 3 0 の中のプリント基板 3 9 に遺伝子検出用 F E T チップ 4 0 をマウントし、ワイヤー 4 1 で電気的にプリント基板 3 9 と接続させる。プリント基板 3 9 にはピン 4 2 が設けられており、信号処理回路 3 8 と接続されている。試料溶液 4 3 は流路 3 1 により遺伝子検出用 F E T チップ 4 0 に導入される。試料溶液 4 3 が信号線となるワイヤー 4 1 に接触しないようにワイヤー部分を保護キャップ 4 4 で保護する。保護キャップ 4 4 の材料はアクリル、ポリプロピレン、ポリカーボネイトなどが適している。

図 1 5 に、フローセル 3 0 の分解図を示す。フローセル本体 3 0 には流路 3 1 となる直径 1 mm の穴が形成されており、遺伝子検出用 F E T チップ (D N A マイクロアレイ) 4 0 の表面に試料／試薬が導入される。流路 3 1 の入口部及び出口部にはネジ 4 5 がきってあり、チューブ 4 6 を通したボルト 4 7 をねじ込むことにより、外部の流路系と接続した。チューブ 4 6 の端面は平坦化処理が施してあり、ボルトをねじ込むことにより平坦部がシール 4 8 として作用して液漏れを防ぐ。

本構成の遺伝子検出用 F E T 測定システムは、フロー方式の測定であるため多数の試料を連續に自動的に処理することができ、高スループットの測定に有効である。実施例 3 に示したインターラーベタを用いる場合、次のステップで測定が行われる。

- (1) 洗浄液をフローセル中に導入
- (2) ハイブリダイゼーション液をフローセル中に導入 (洗浄液を置換)
- (3) 各シリコン膜形成領域の温度を各核酸プローブの最適温度に設定
- (4) 遺伝子検出用 F E T 及び参照 F E T の出力を測定、差の演算
- (5) 試料をバルブに分注して、ハイブリダイゼーション液でフローセルに導入
- (6) フローセル中でハイブリダイゼーション

- (7) 緩衝液をフローセルに導入して、未反応の試料を除去
- (8) インターカレータ溶液をフローセルに導入・反応
- (9) 緩衝液を導入して未反応のインターカレータ液を除去
- (10) 遺伝子検出用FET及び参照FETの出力を測定、差の演算
- (11) 各シリコン膜形成領域の温度を95℃に設定
- (12) 洗浄液を導入して、フローセル中を洗浄
- (13) (1)に戻る

上記測定シーケンスを図16に示す。試料及びインターカレータを導入して洗浄し、FETの出力電位を測定した後、シリコン膜形成領域の温度を95℃に上昇させて、ハイブリダイズした二本鎖DNAを解離させて一本鎖DNAとし、二本鎖に挿入されたインターカレータとともに洗浄液で除去する。すると、FETのゲート上には核酸プローブのみが残り、最初の状態に戻って次の測定を行うことができる。

実施例4に示したイオンと複合体を形成する分子（リガンド）を用いたSNP解析の場合、次のステップで測定が行われる。

- (1) 洗浄液をフローセル中に導入
- (2) ハイブリダイゼーション液をフローセル中に導入（洗浄液を置換）
- (3) 各シリコン膜形成領域の温度を各核酸プローブの最適温度に設定
- (4) 遺伝子検出用FET及び参照FETの出力を測定、差の演算
- (5) 試料をバルブに分注して、ハイブリダイゼーション液でフローセルに導入
- (6) フローセル中でハイブリダイゼーション
- (7) 緩衝液をフローセルに導入して、未反応の試料を除去
- (8) 50mM NaCl溶液をフローセルに導入・反応
- (9) 遺伝子検出用FET及び参照FETの出力を測定、差の演算
- (10) 50mM KCl溶液をフローセルに導入・反応
- (11) 遺伝子検出用FET及び参照FETの出力を測定、差の演算

各FETの核酸プローブ情報とNaCl中及びKCl中の差動出力からNormal/Normal、Mutant/Mutant、Normal/Mutantを判定

- (12) 緩衝液を導入してKCl溶液を除去
- (13) 各シリコン膜形成領域の温度を95℃に設定
- (14) 洗浄液を導入して、フローセル中を洗浄
- (15) (1)に戻る

産業上の利用可能性

本発明では、電界効果トランジスタのゲート絶縁物表面に核酸プローブを固定化し、ターゲット遺伝子とゲート絶縁物表面でハイブリダイゼーションを行わせ、その際に生ずる表面電荷密度の変化を電界効果を利用して検出する方式のDNAマイクロアレイを提供する。表面電荷密度の変化を大きくするために、核酸自身が持っている電荷に加えて、インターラーダの導入やイオンなどの荷電粒子と複合体を形成する分子を核酸に標識することにより、大きな信号／雑音比で表面電位変化のポテンシオメトリック検出が可能なDNAマイクロアレイを実現できる。本発明のDNAマイクロアレイシステムは高価なレーザや複雑な光学検出系を必要とせず、また電流検出（アンペロメトリック）方式と異なり、絶縁物基板に核酸プローブを固定化して平衡状態での表面電位を検出するので、基板の腐食やガスの発生、酸化／還元物質の妨害などによる信号値の不安定性は問題とならず、安定性に優れた高精度の遺伝子検出が可能となる。

請 求 の 範 囲

1. ゲート絶縁物表面に直接又は担体を介して一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブを固定化した複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタと、参照電極とを備えることを特徴とするポテンシオメトリックDNAマイクロアレイ。
2. 複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタが形成された基板を備え、前記基板の表面において、各絶縁ゲート電界効果トランジスタのチャネル部のゲート絶縁物上に直接又は担体を介してそれぞれ異なる種類の一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブを固定化したことを特徴とするポテンシオメトリックDNAマイクロアレイ。
3. 検出すべき核酸の一部と相補的な塩基配列を有する核酸プローブを直接又は担体を介してゲート絶縁物表面に固定化した第1の絶縁ゲート電界効果トランジスタと、
検出すべき核酸のどの部分とも相補的ではない塩基配列を有する核酸プローブを直接又は担体を介してゲート絶縁物表面に固定化した第2の絶縁ゲート電界効果トランジスタと、
前記第1の絶縁ゲート電界効果トランジスタと前記第2の絶縁ゲート電界効果トランジスタの出力を比較検出する回路とを備えることを特徴とするポテンシオメトリックDNAマイクロアレイ。

4. (a) それぞれ異なる種類の一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブがゲート絶縁物表面に直接又は担体を介して固定化された複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタを有する基板上に、少なくとも1種類の核酸を含む試料溶液を導入して、前記一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブとハイブリダイゼーションを行わせるステップと、
(b) 洗浄液を前記基板上に導入して、未反応の核酸を前記基板上から除去するステップと、
(c) インターカレータ溶液を上記基板上に導入して、二本鎖となった核酸と反応させるステップと、
(d) 洗浄液を前記基板上に導入して、未反応のインターカレータを基板上か

ら除去するステップと、

(e) 緩衝液を前記基板上に導入して、前記絶縁ゲート電界効果トランジスタの出力値を測定するステップとを有することを特徴とする核酸解析方法。

5. 請求項4記載の核酸解析方法において、

(f) 前記基板を加熱して前記一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブとハイブリダイズした核酸を解離させるステップと、

(g) 洗浄液を前記基板上に導入して、前記一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブから解離した核酸及びインターラーダーを除去するステップとを更に有し、

その後、前記ステップ(a)からステップ(e)を反復することを特徴とする核酸解析方法。

6. (a) それぞれ異なる種類の一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブがゲート絶縁物表面に直接又は担体を介して固定化された複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタを有する基板上に、荷電粒子を取り込みうる分子で標識された核酸断片を含む試料溶液を導入して、前記一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブとハイブリダイゼーションを行わせるステップと、

(b) 洗浄液を前記基板上に導入して、未反応の核酸断片を基板上から除去するステップと、

(c) 前記標識分子と複合体を形成するイオンを含む溶液を前記基板上に導入して、二本鎖となった核酸に標識されている分子と反応させ、前記イオンと前記標識分子との複合体を形成させるステップと、

(d) 前記絶縁ゲート電界効果トランジスタの出力値を測定するステップとを備えることを特徴とする核酸解析方法。

7. 請求項6記載の核酸解析方法において、前記荷電粒子を取り込みうる分子は、1価又は2価の陽イオン又は陰イオンと選択的に複合体を形成する分子であることを特徴とする核酸解析方法。

8. 請求項6又は7記載の核酸解析方法において、荷電粒子を取り込みうる複数種類の分子をそれぞれ異なる核酸断片に標識し、前記各分子に対応した荷電粒子(イオン)を前記基板上に導入することにより複数種類の遺伝子又は遺伝

子多型を同時又は順次に測定することを特徴とする核酸解析方法。

9. 請求項 6～8 のいずれか 1 項記載の核酸解析方法において、

(e) 前記基板を加熱して前記一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブとハイブリダイズした核酸断片を解離させるステップと、

(g) 洗浄液を前記基板上に導入して、前記一本鎖核酸プローブ又は分枝核酸プローブから解離した核酸断片を除去するステップとを更に有し、

その後、前記ステップ (a) からステップ (d) を反復することを特徴とする核酸解析方法。

10. 絶縁物基板の第 1 の表面にシリコン膜を形成するステップと、

前記シリコン膜をパターニングして複数のシリコン膜形成領域に分離するステップと、

各シリコン膜形成領域中にそれぞれ電界効果トランジスタのソース・ドレイン領域、ヒーター、温度センサとなる複数の p n 接合を形成するステップと、

前記ソース・ドレイン領域の間をチャネルとし、前記ソース・ドレイン領域から信号配線を形成するステップと、

前記絶縁物基板の前記シリコン膜を形成した面と反対側の第 2 の表面において、前記電界効果トランジスタのチャネルに対応する部分に核酸プローブを直接又は担体を介して固定化するステップとを有することを特徴とするDNAマイクロアレイの製作方法。

11. 絶縁物基板の表面にシリコン膜を形成するステップと、

前記シリコン膜をパターニングして複数のシリコン膜形成領域に分離するステップと、

各シリコン膜形成領域中にそれぞれ電界効果トランジスタのソース・ドレイン領域、ヒーター、温度センサとなる複数の p n 接合を形成するステップと、

前記ソース・ドレイン領域の間をチャネルとし、前記ソース・ドレイン領域から信号配線を形成するステップと、

前記信号配線を形成した面の上に絶縁膜を形成するステップと、

前記絶縁膜の表面において、前記電界効果トランジスタのチャネルに対応する部分に核酸プローブを直接又は担体を介して固定化するステップとを有する

ことを特徴とするDNAマイクロアレイの製作方法。

図1

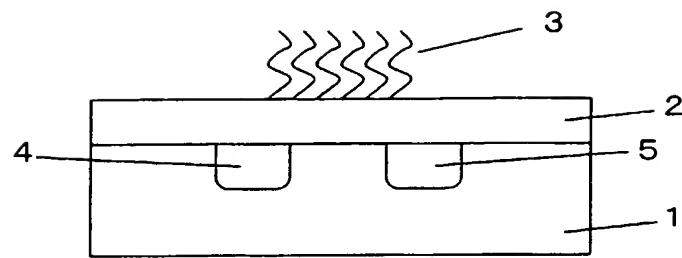


図2

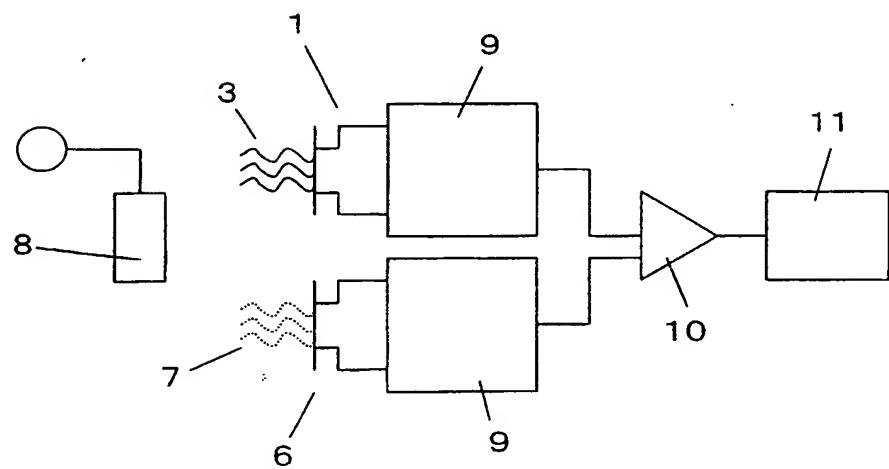


図3

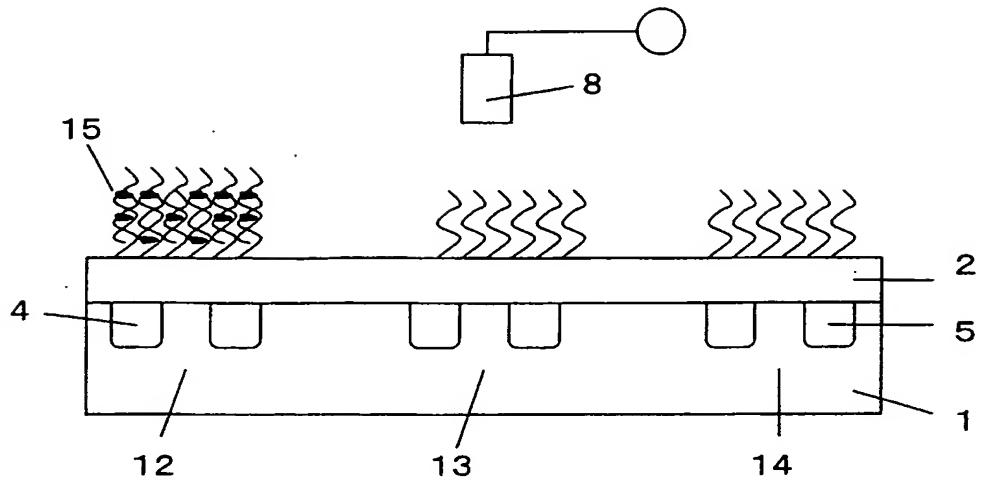


図4

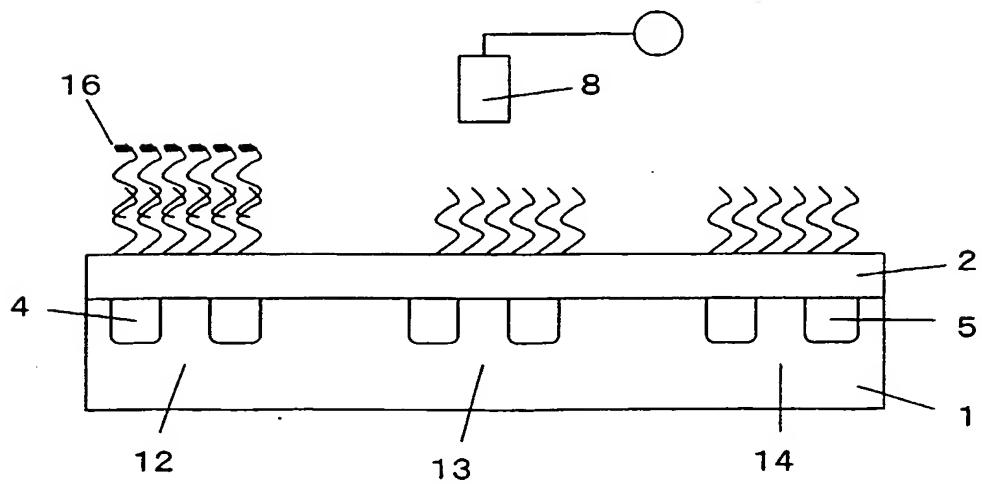


図5

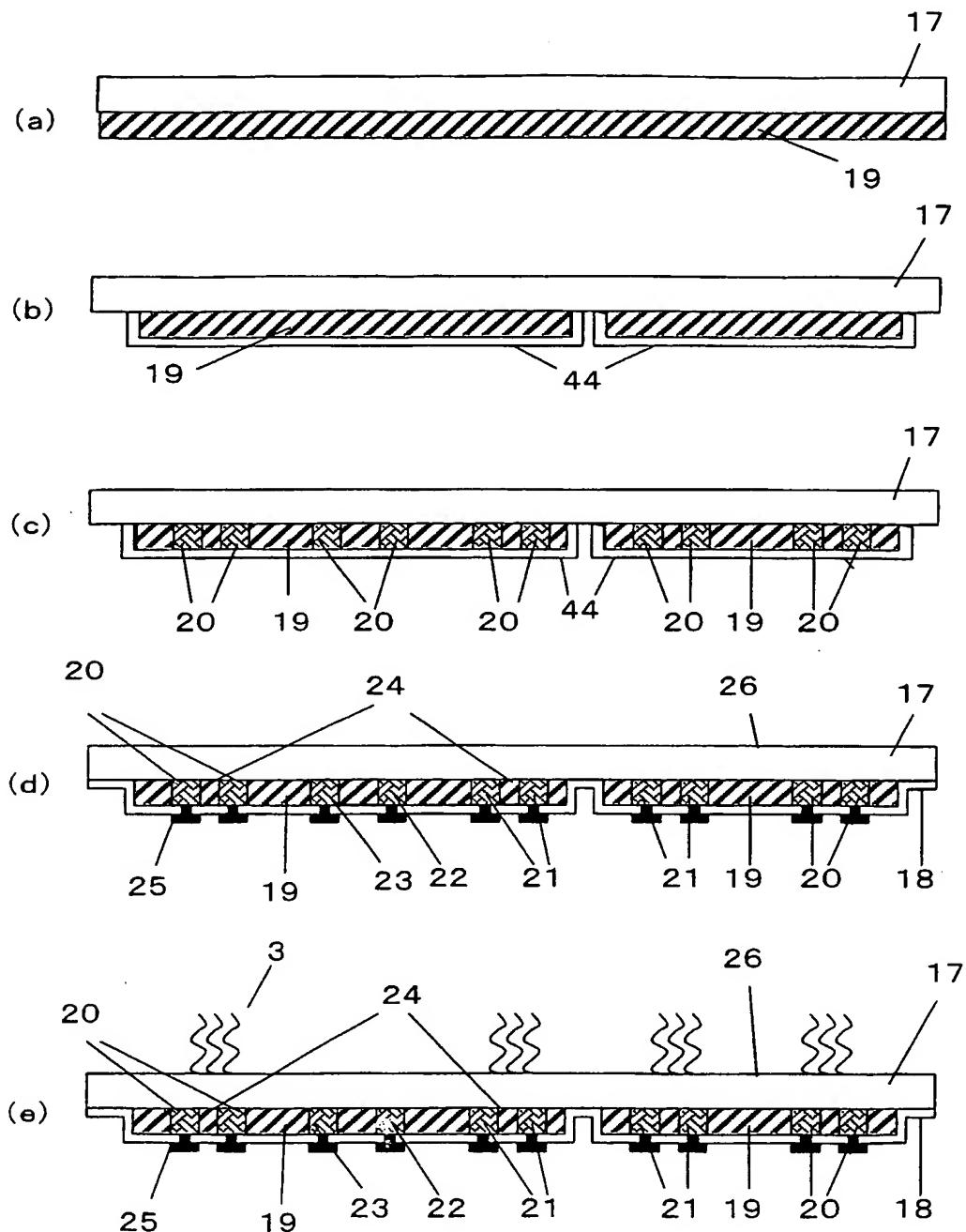


図6

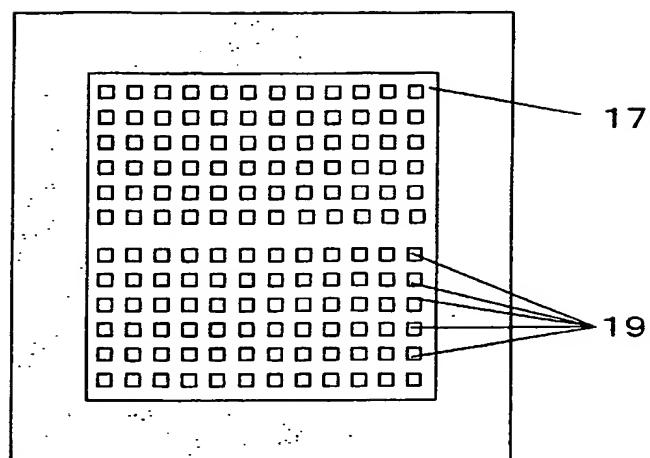


図7

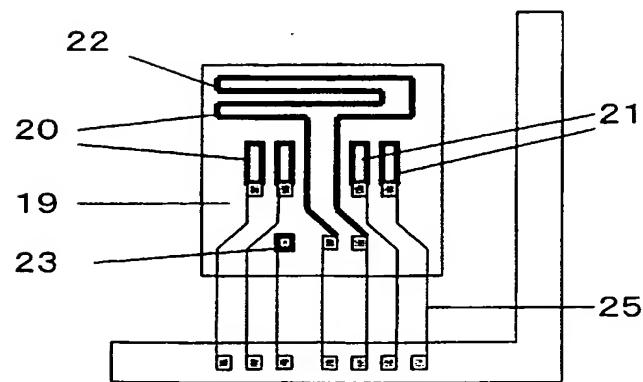


図8

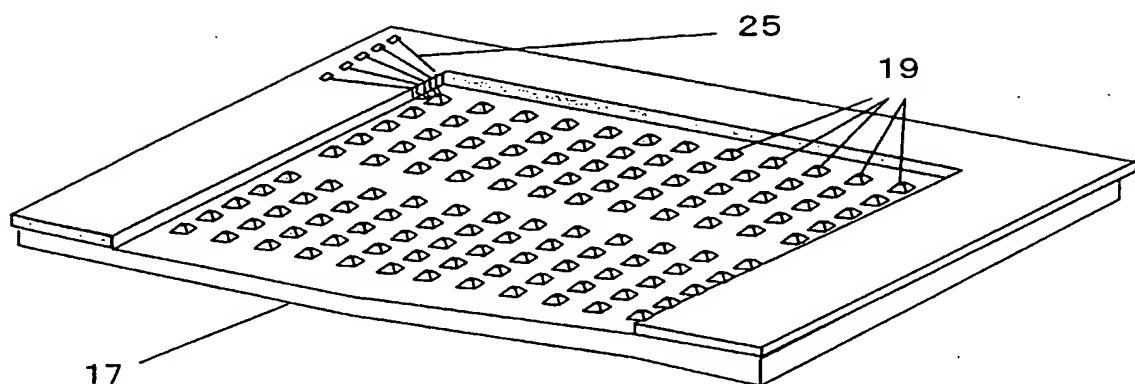


図9

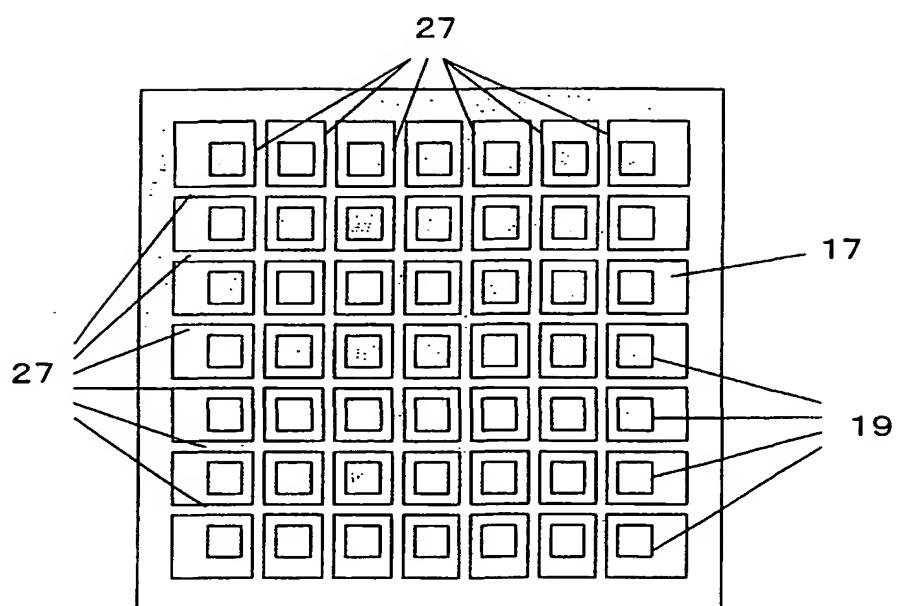


図10

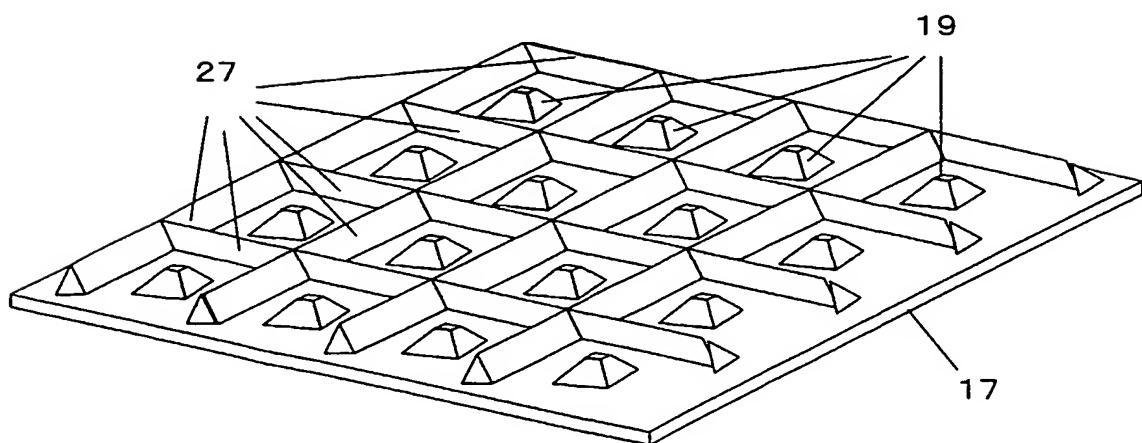


図11

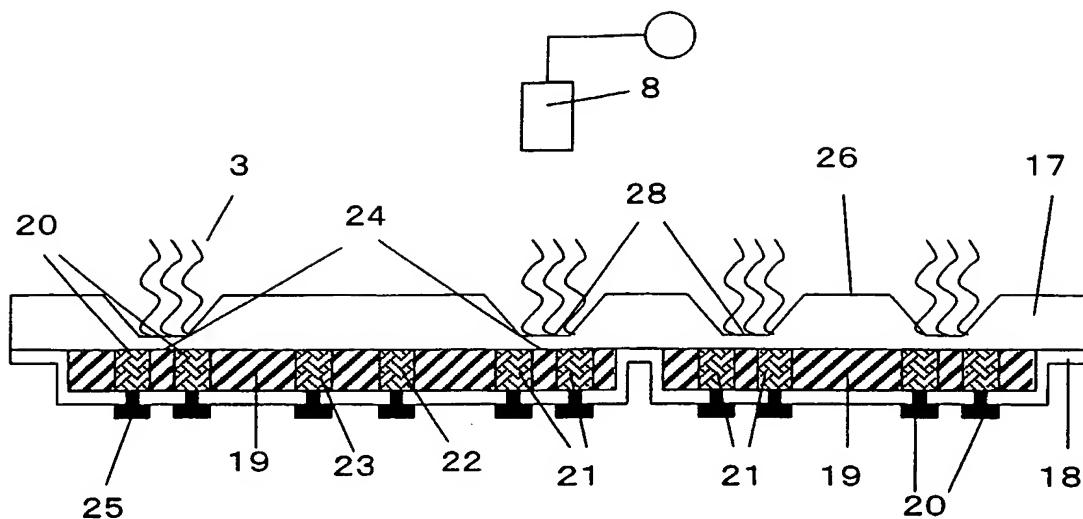


図12

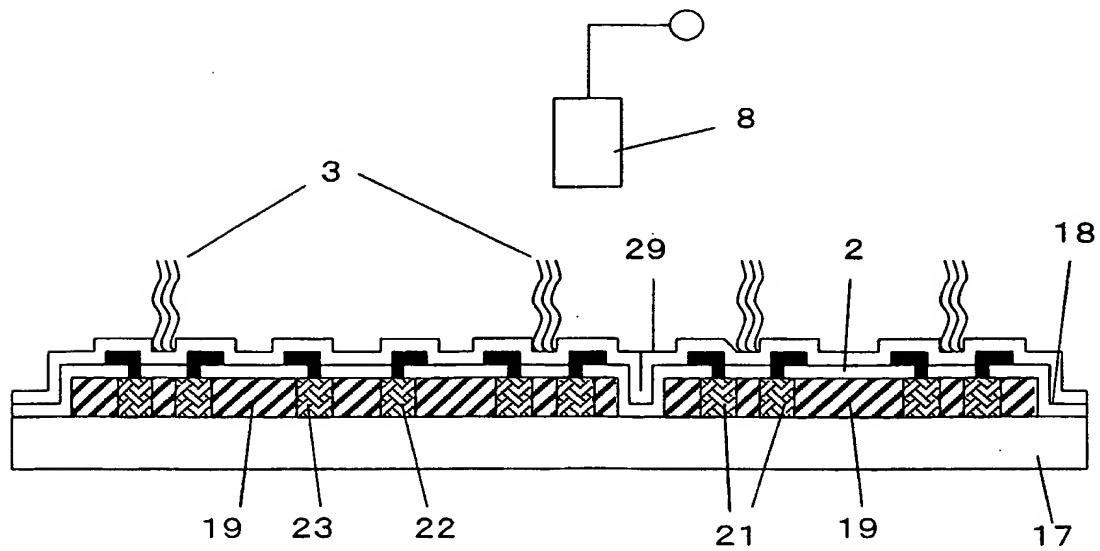


図13

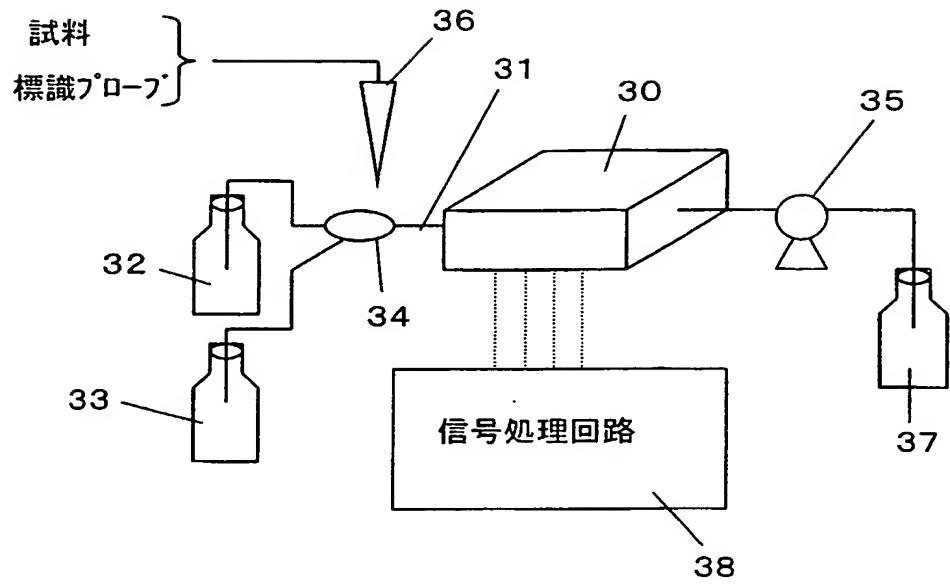


図14

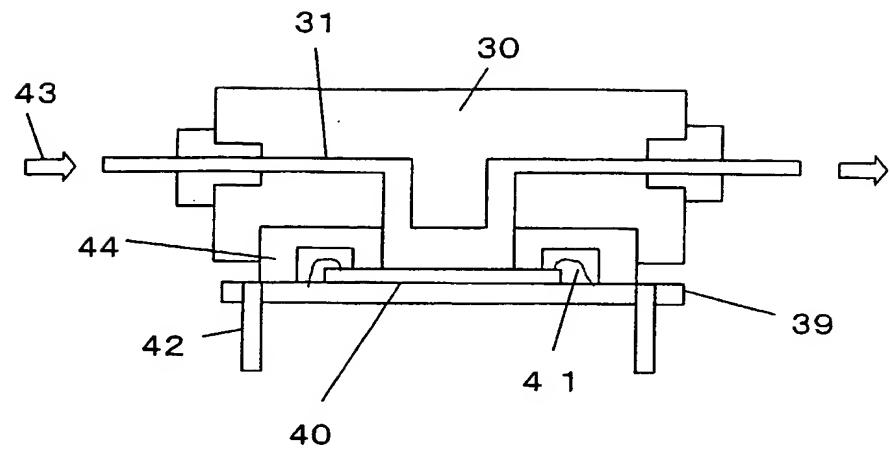


図15

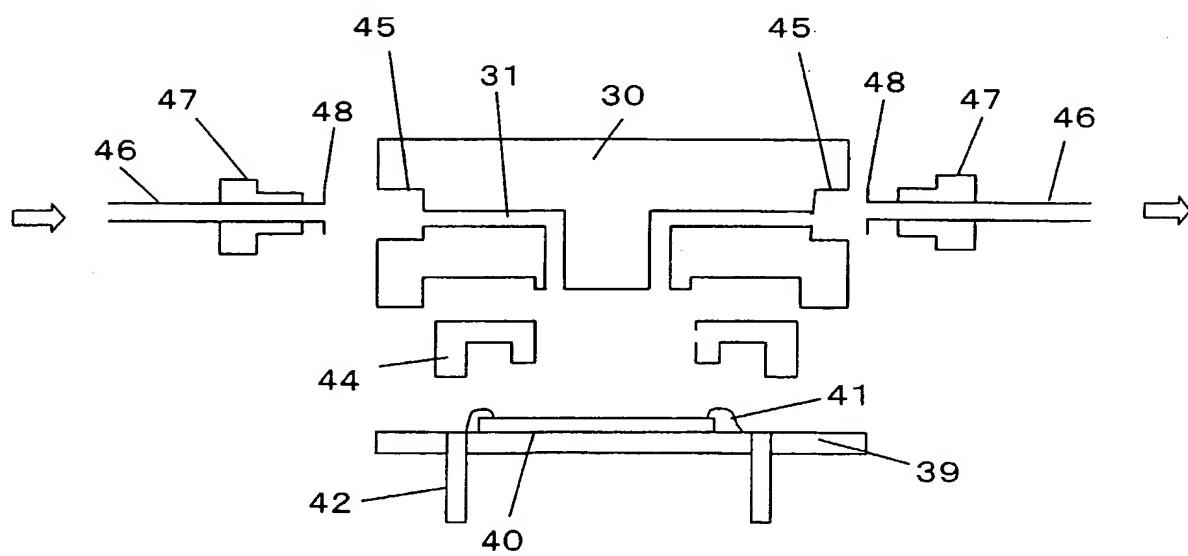
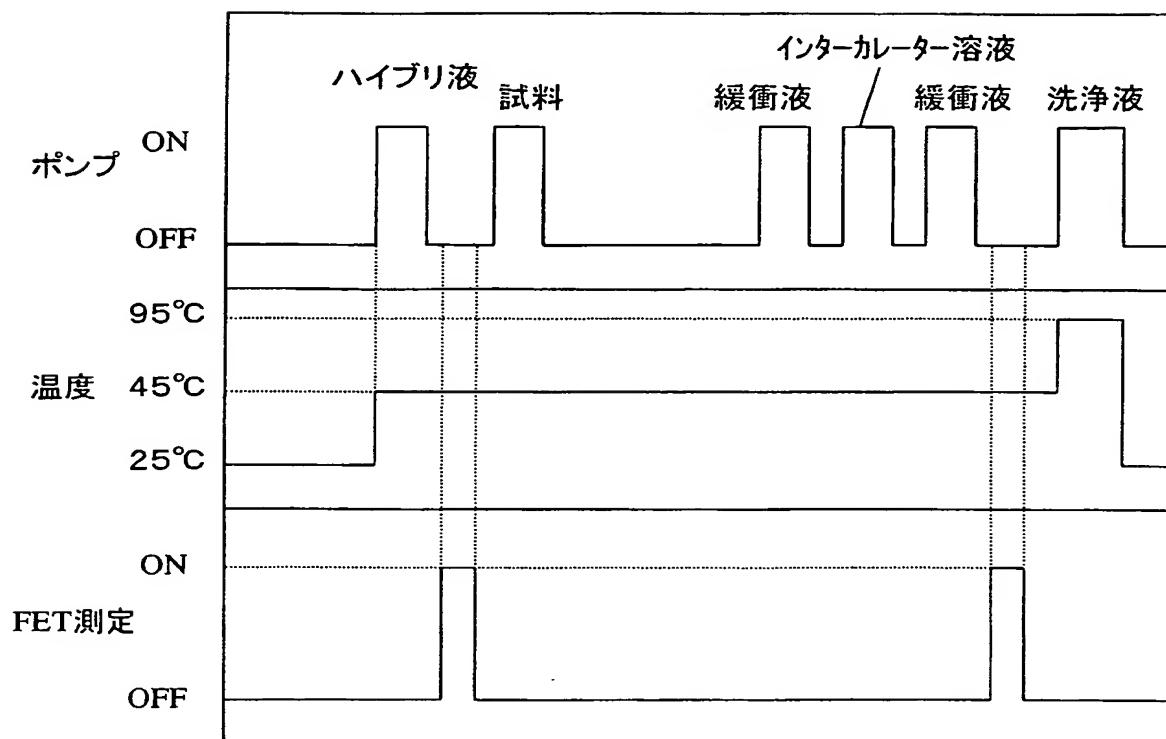


図16



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/11150

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C12N15/09, C12Q1/68, C12M1/00, H01L29/06, H01L29/66

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12N15/09, C12Q1/68, C12M1/00, H01L29/06, H01L29/66

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS) MEDLINE (STN) WPI (DIALOG) BIOSIS (DIALOG)
INSPEC (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Yuji MIYAHARA, "Microfabrication-gijutsu o Mochiiru Biosensing System", Chromatography, May 2001, Vol.22, pages 83 to 84	1-11
A	Yi CUI et al., Nanowire Nanosensors for Highly Sensitive and Selective Detection of Biological and Chemical Species, Science, August 2001, Vol.293, No.5533, pages 1289 to 1292	1-11
A	Graham RAMSAY et al., DNA chips: State-of-the art, Nature Biotechnology, 1998, Vol.16, No.1, pages 40 to 44	1-11
A	EP 882979 A1 (Commissariat A L'energie Atomique), 09 December, 1998 (09.12.98), & JP 11-31806 A & FR 2764386 A	1-11

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
30 April, 2002 (30.04.02)Date of mailing of the international search report
14 May, 2002 (14.05.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/11150

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	S.AMEUR et al., Immunosensing Using Electrochemical Impedance Spectroscopy on Functionalized Gold Electrodes., Chemical and Biological Sensors and Analytical Electrochemical Methods, 1997, pages 1019 to 1023	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.C1' C12N 15/09, C12Q 1/68, C12M 1/00, H01L 29/06, H01L 29/66

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.C1' C12N 15/09, C12Q 1/68, C12M 1/00, H01L 29/06, H01L 29/66

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS) MEDLINE(STN) WPI(DIALOG) BIOSIS(DIALOG) INSPEC(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	宮原 裕二, Microfabrication技術を用いるバイオセンシングシステム, Chromatography, May 2001, Vol. 22, p. 83-84	1-11
A	Yi CUI et al., Nanowire Nanosensors for Highly Sensitive and Selective Detection of Biological and Chemical Species, Science, August 2001, Vol. 293, No. 5533, p. 1289-1292	1-11
A	Graham RAMSAY et al., DNA chips: State-of-the art, NATURE BIOTECHNOLOGY, 1998, Vol. 16, No. 1, p. 40-44	1-11

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 04. 02

国際調査報告の発送日

14.05.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4 B 9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	EP 882979 A1 (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) 1998. 12. 09 & JP 11-31806 A & FR 2764386 A	1-11
A	S. AMEUR et al., Immunosensing Using Electrochemical Impedance Spectroscopy on Functionalized Gold Electrodes., Chemical and Biological Sensors and Analytical Electrochemical Methods, 1997, p. 1019-1023	1-11